

10/511796

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 11 月 6 日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/091430 A1(51) 国際特許分類:
9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

C12N 15/09,

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/05375

(22) 国際出願日:

2003 年 4 月 25 日 (25.04.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-125353 2002 年 4 月 26 日 (26.04.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 早出 広司 (SODE, Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南 1-13-16 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(74) 代理人: 小林 孝次 (KOBAYASHI, Takashi); 〒171-0022 東京都豊島区南池袋 2-47-6 パレス南池袋 701号 Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE β -SUBUNIT AND DNA ENCODING THE SAME(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素 β サブユニット及びそれをコードする DNA(57) Abstract: A DNA fragment encoding the β -subunit is obtained by inverse PCR with the use of a primer designed based on the base sequence of the N-terminal signal sequence region of the β -subunit of GDH originating in *Burkholderia cepacia* KS1 strain.(57) 要約: フルクホルデリア・セバシア KS1 株由来 GDH の β サブユニットの N 末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたプライマーを用いたインバース PCR により、 β サブユニットをコードする DNA 断片を得る。

WO 03/091430 A1

明細書

グルコース脱水素酵素 β サブユニット及びそれをコードするDNA

技術分野

本発明は、グルコース脱水素酵素の β サブユニットを構成するチトクロームC、それをコードするDNA、及びそれらの利用に関する。グルコース脱水素酵素は、酵素電極を用いたグルコースセンサ等に有用である。

背景技術

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その中でも特にバイオセンサの1つであるグルコースセンサは、主に医療分野で測定方法やその方法を利用した装置の開発が盛んに行われている。例えばグルコースセンサは、1962年にClarkとLyonsによってグルコースオキシダーゼと酸素電極を組み合わせたバイオセンサーの報告 (L. c. Clark, J. and Lyons, C. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." Ann, n. y. Acad. Sci. 105:20-45) が最初にされて以来、約40年ほどの歴史を有している。

このように、グルコースセンサに、酵素としてグルコースオキシダーゼが採用されてからの歴史は長い。なぜならグルコースオキシダーゼは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、更に酵素の量産化が可能であり、生産コストが他の酵素と比べて安価である、からである。基質特異性が高いということは、酵素がグルコース以外の糖とは反応しないため、測定値に誤差を生じることなく、正確な測定が行なえるという利点に通じる。また、熱安定性に優れているということは、酵素が熱により変性し酵素活性が失活するという問題を防止することができ、長期間正確な測定が行えるという利点に通じる。

しかし、グルコースオキシダーゼは、上記の様なメリットを有している反面、例えば溶存酸素の影響を受け、測定結果に影響があるという問題も有している。

一方、グルコースオキシダーゼ以外には、グルコース脱水素酵素（以下、「グルコースデヒドロゲナーゼ」又は「GDH」ともいう）を利用したグルコースセン

サの開発も行われてきた。そして、酵素も、微生物から発見されている。例えば、バチルス (Bacillus) 属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) 及びクリプトコッカス (Cryptococcus) 属由来グルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) が知られている。

前者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.47) は、 β -D-グルコース + $\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{D-}\delta\text{-グルコノラクトン} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ の反応を触媒する酵素であり、後者のグルコースデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.119) は、 $\text{D-グルコース} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{D-}\delta\text{-グルコノラクトン} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ の反応を触媒する酵素であり、前述した微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼは、既に市販もされている。

これらグルコースデヒドロゲナーゼは、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないという利点を有する。このことは、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、測定結果に誤差を及ぼさずに正確に測定することができるという利点に通じる。

しかし、従来に見られるグルコースデヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受けない一方、熱安定性が悪く、基質特異性がグルコースオキシダーゼよりも劣るという問題点を有しており、センサに採用される酵素として、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼの両欠点を補う酵素の提供が望まれていた。

尚、本発明者は Sode, K., Tsugawa, W., Yamazaki, T., Watanabe, M., Ogasawara, N., and Tanaka, M., (1996) *Enzyme Microb. Technol.* 19, 82-85. や、Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) *Appl. Biochem. and Biotech.* 77-79/0325 や、Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) *Biotech. Lett.* 21, 199-202 において、温泉近くの土壌より採取した試料を用い、GDH についての研究結果を報告している。この試料中の微生物が産出する GDH は補酵素結合型であり、すでに至適反応温度、熱安定性、基質特異性などの酵素学的性質が明らかとなっている (前記文献)。本酵素は高い耐熱性を持つ触媒サブユニット (α サブユニット)、電子伝達サブユニット (β サブユニット)、機能不明の γ サブユニットから構成されているヘテロオリゴマー酵素であり、活性のピークを 45℃ と 75℃ に持つ。また、 γ 、 α サブユニット遺伝子はクローニングされており、上記微生物がブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) に属すること、及び β サブユニットの N

末端アミノ酸配列も明らかにされている（猪瀬 健、東京農工大学修士論文（2001年））。しかし、 β サブユニット遺伝子の構造は未だ報告されていない。

発明の開示

本発明は、ブルクホルデリア属微生物のGDH β サブユニットをコードするDNA、及びその利用法を提供することを課題とする。

本発明者は、ブルクホルデリア・セパシア KS1株のGDHに関する研究をさらに進め、GDH β サブユニットをコードするDNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

(2) 以下の(A)又は(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

(3) 以下の(a)又は(b)に示すDNAである(2)に記載のDNA。

(a) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA。

(4) さらに配列番号15の塩基番号121～187からなる塩基配列を含む

(3)に記載のDNA。

(5) (2)～(4)のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。

(6) (2)～(4)のいずれかに記載のDNA又は(5)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(7) (6)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素 β サブユニットを産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素 β サブユニットの製造方法。

(8) さらにブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素 α サブユニット及び γ サブユニットをコードする塩基配列を含む(3)又は(4)に記載のDNA。

(9) (8)に記載のDNAを含有する組換えベクター。

(10) (8)に記載のDNA又は(9)に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(11) (10)に記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシアKS1株のGDH β サブユニットをコードするDNAを検索し、単離した。同菌株は、2000年9月25日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。本明細書において、GDH β サブユニットをコードするDNAを、本発明のDNA、「 β サブユニット構造遺伝子」又は単に「 β サブユニット遺伝子」ということがある。

本発明者らは、ブルクホルデリア・セパシア KS1株が産生するGDHは、 α サブユニット、 β サブユニット、及び γ サブユニットを含む多量体タンパク質であることを確認している。本発明のタンパク質は、これらのサブユニットのうち、 β サブユニットである。GDHの分光光度解析により、酸化型GDHの吸収波長はグルコ

ノバクター S p.、アセトバクター s p. のデヒドロゲナーゼチトクローム複合体でできているアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの吸収波長と類似しており、熱処理によりこの吸収は失われる。このことと、下記に示す β サブユニットの有無による GDH の至適反応温度の相違から、 β サブユニットはチトクローム C からなっていることが示唆された。

以下に、上記 GDH の理化学的性質を示す。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約 60 kDa と分子量約 43 kDa を示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約 380 kDa を示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0）。

また、 α サブユニット単独では、以下の理化学的性質を示す。

①' グルコース脱水素酵素活性を有する。

②' 還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約 60 kDa を示す。

③' 至適反応温度：

75℃付近（Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0）。

β サブユニットは、ブルクホルデリア・セバシア KS1 株の培養物から、GDH 活性を指標として GDH 複合体を精製することにより、他のサブユニットとともに取得することができる。GDH 活性は、公知の GDH の活性測定と同様の方法で測定することができる。具体的には、例えば次のようにして測定することができる。594 μ M の 1-メトキシフェナジンメトサルフェート (mPMS) および 5.94 μ M の 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に、酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え、37℃でインキュベートする。分光光度計を用いて DCIP の 600nm における吸光度変化を追跡し、当該

吸光度の減少速度を酵素反応速度とする。

また、本発明により β サブユニットをコードする遺伝子の塩基配列（配列番号15）が明らかにされたので、この塩基配列を有するDNA又は同DNAがコードするアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを適当な宿主で発現させることによって β サブユニットを製造することができる。配列番号15のオープンリーディングフレーム（ORF）がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号16に、示す。タンパク質から決定した β サブユニットのN末端アミノ酸配列は、配列番号16のアミノ酸番号23～38と一致していた。したがって、アミノ酸番号1～22はシグナルペプチドであると推定される。尚、配列番号15及び16において、第1番目のアミノ酸残基はValと記載されているが、Metである可能性が高く、また、翻訳後に脱落している可能性がある。

上記アミノ酸配列についてBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム（*Ralstonia solanacearum*）由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと65%、グルコノバクター・オキシダンス（*Gluconobacter oxydans*）由来のソルビトール脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと48%、エルビニア・シプリペディイ（*Eriwinia cypripedii*）由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと44%、パントエア・シトレア（*Pantoea citrea*）由来2-ケトーグルコン酸脱水素酵素のシトクロムcサブユニットと塩基配列レベルで55.7%、アミノ酸レベルで46.4%と、全体にわたって高い相同性を示していた。またこれらのシトクロムcのアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号18）配列が保存されていた。これらのことから、本発明の β サブユニットがチトクロームCであることが示された。

本発明の β サブユニットは、GDHの β サブユニットとして機能し得る限り、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、GDHの β サブユニットとして機能するとは、GDHの酵素活性を損なわずにチトクロームCとして機能することをいう。

本発明のDNAは、上記 β サブユニットをコードするDNAであり、例えばブルクホルデリア・セバシアKS1株から取得することができる。本発明のDNAは、本発明を完成する過程においては、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAから単離された。本発明のDNAは、例えば、配列番号13及び14に示す塩基配列を有するプライマーを用い、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。また、本発明によりその塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとなったので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによって、ブルクホルデリア・セバシアKS1株の染色体DNAから取得することもできる。また、ブルクホルデリア・セバシアの他の菌株からも、同様にしてバリエーションを取得することができる。

本発明のDNAは、配列番号16のアミノ酸番号23～425からなるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものの他、このアミノ酸配列において、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、GDH β サブユニットとして機能するタンパク質をコードするものであってもよい。

本発明のDNAとしては、具体的には、配列番号15の塩基番号187～1398からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。また本発明のDNAは、配列番号15又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 β サブユニットとして機能し得るタンパク質をコードするDNAであってもよい。ストリンジェントな条件としては、70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズする条件、具体的には、1×SSC、0.1%SDS、60℃が挙げられる。

本発明のDNA又は同DNAを含む組換えベクターを保持する形質転換体を培養して、同DNAの発現産物としてGDH β サブユニットを産生させ、これを菌体又は培養液から採取することにより、GDH β サブユニットを製造することができる。その際、本発明のGDH β サブユニットをコードするDNAは、さらに α サブ

ユニットをコードするDNA、又はさらに γ サブユニットをコードするDNAとともに発現させることによって、GDH複合体を製造することができる。 γ サブユニット及び α サブユニットを連続してコードするDNA断片は、配列番号18及び19に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRによって、取得することができる。

GDH β サブユニット又はGDH複合体を産生させる微生物としては、大腸菌をはじめとする腸内細菌群、シュードモナス属やグルコノバクター属などのグラム陰性細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌をはじめとするグラム陽性細菌、サッカロマイセス・セレビシエ等の酵母、アスペルギルス・ニガー等の糸状菌が挙げられるが、これらに限られず、異種タンパク質生産に適した宿主微生物であれば用いることができる。

本発明のDNAのクローニング又は発現に使用するベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るプラスミド又はファージから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。エシェリヒア・コリ用のベクターとしては、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pTrc99A、pBluescriptあるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。一旦本発明のDNAのクローニングに使用したベクターより、発現等に適した他の組換えベクターへの移入は、本発明のDNAを保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法により同DNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、例えばエシェリヒア属細菌ではカルシウム処理によるコンピテントセル法、バチルス属細菌ではプロトプラスト法、酵母ではKU法やKUR法、糸状菌ではマイクロマニピレーション法等の方法によって行うことができる。また、エレクトロポレーション法も広く用いることができる。

宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカー等を指標とすればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有

利である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は菌が生育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、本発明のタンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

培養物中の本発明のタンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、本発明のタンパク質が培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、本発明のタンパク質を含有する溶液と微生物菌体と分離した後に利用される。本発明のタンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加して本発明のタンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

上記のようにして得られたタンパク質含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製を行うことにより、精製された本発明のタンパク質を得る。

ことができる。

カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましいが、 α サブユニット又は γ サブユニットが含まれていてもよい。

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。

本発明の β サブユニット及び α サブユニット、もしくは必要に応じてさらに γ サブユニットからなるGDH複合体、又はそれを保持する形質転換体は、グルコースセンサの酵素電極として用いることができる。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明のGDHを固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコースの濃度を計算することができる。

また、本発明の β サブユニットを含むGDH複合体は、グルコース等の糖類アッセイキットの構成要素とすることができる。典型的には、キットは、GDH複合体に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカー

ブ作成のためのグルコースなどの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

参考例 1 ブルクホルデリア・セパシア KS1株GDH α サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セパシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。すなわち、同菌株をTL液体培地(ポリペプトン 10 g、酵母抽出液 1 g、NaCl 5 g、 KH_2PO_4 2 g、グルコース 5 g; 1 L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ のプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

<2>GDH α サブユニットのN末端アミノ酸配列の決定

実施例2と同様にして精製したGDHを凍結乾燥によって濃縮後、12.5%ポリアクリルアミドを用いたSDS-電気泳動法を用いて展開し、 α サブユニットを分離した。こうして得られた α サブユニットをポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー(島津製作所製、PPSQ-10)によりN末端アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素には配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2~12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

<3> α サブユニットをコードする遺伝子のクローニング

<1>で調製したDNA 1 μ gを制限酵素Sau3AIで限定分解した。これをCIAP（仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ）処理した。一方、コスミドであるSuperCosI（ストラジーン社から入手）をBamHI処理し、T4 DNAリガーゼにより、SuperCosIに α -15株由来の染色体DNA断片をSau3AIで限定分解して得られたDNA断片を組み込んだ。得られた組換えDNAでエシェリヒア・コリXL-1 Blue MR（ストラジーン社から入手）を形質転換した。形質転換体はSuperCosI上の抗生物質耐性であるネオマイシン耐性およびアンピシリン耐性にしたがって10 μ g/mlのネオマイシンおよび25 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地から選抜した。得られた形質転換体をLB液体培地で培養した。これらの形質転換菌体を集菌後、GDH活性測定試薬に懸濁し、グルコースに対する脱水素酵素活性を指標にクローンを選抜した。その結果、1株のグルコース脱水素酵素活性を示すクローンが得られた。

<4> サブクローニング

<3>で得られた α サブユニットをコードする遺伝子を含むコスミドSuperCosIから、目的遺伝子を含むDNA断片を調製した。同コスミドから挿入遺伝子断片を制限酵素NotIにより切り出した。このDNA断片を制限酵素XbaIで処理し、それらの断片をXbaIで消化したプラスミドpUC18に組み込んだ。各挿入断片を含むプラスミドpUC18でエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養し、それぞれの細胞のGDH活性を<3>と同様に調べた。その結果、一つの形質転換体にGDH活性を示す株が得られた。この形質転換体からプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約8.8kbpの挿入断片が確認された。本プラスミドをpKS1と命名した。

<5> 塩基配列の決定

pKS1の挿入DNA断片について、制限酵素解析及び常法に従い塩基配列を決定した。その結果、本挿入DNA断片中に、<2>で明かとなった α サブユニットのN末端アミノ酸配列をコードするDNA配列が確認され、この配列を含むオープンリーディングフレームが見つかった。決定した塩基配列および同塩基配列がコードし

得るアミノ酸配列は、配列番号 1 および 3 に示す通りである。尚、後述するように、配列番号 1 の塩基配列のうち、塩基番号 2 3 8 6 以降の塩基配列は、配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードしており、 β -サブユニットをコードしていると推定された。

参考例 2 組換え大腸菌による GDH α サブユニットの生産

α サブユニットの塩基配列が決定されたことにより、前記 α サブユニットの構造遺伝子を用いてベクターを作製し、更に前記ベクターにより形質転換体の製造を行った。

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

K S 1 株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR 反応により増幅した。PCR 反応には次の 1 組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CCCAAGCTTGGGCCGATACCGATACGCA-3' (配列番号 5)

(リバーズ)

5'-GAGAAGCTTTCCGCACGGTCAGACTTCC-3' (配列番号 6)

PCR により増幅された遺伝子を制限酵素 HindIII で消化した後、発現ベクター pFLAG-CTS (SIGMA 社) のクローニング部位である HindIII 部位に挿入した。得られたプラスミドを pFLAG-CTS/ α と命名した。

前記プラスミド pFLAG-CTS/ α でエッシェリヒア・コリ DH5 α M C R 株を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地で生じるコロニーを採取した。

さらに p K S 1 挿入断片について、 α サブユニットの上流に関してオープンリーディングフレームを検索したところ、新たに配列番号 2 に記載される 168 アミノ酸残基から構成されるポリペプチドをコードする 507 塩基から構成される構造遺伝子 (配列番号 1 中塩基番号 258 ~ 761) が見出された。この構造遺伝子は、 γ サブユニットをコードしていると考えられた。

α サブユニットのコード領域の上流に、 γ サブユニットをコードする領域の存在が明らかになったことから、 γ サブユニットと α サブユニットが連続するポリシストロン構造の遺伝子を含む組換えベクターを作製し、同ベクターを導入した形質転換体を構築した。

まずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

γ サブユニットの構造遺伝子および α サブユニットの構造遺伝子が連続するK S 1株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACACT-3' (配列番号7)

(リバーズ)

5'-CCCAAGCTTGGGTCAGACTTCCTTCTTCAGC-3' (配列番号8)

このPCRにより増幅された遺伝子の5'末端をNcoI、3'末端をHindIIIで消化した後、ベクターpTrc99A (Pharmacia社) のクローニング部位である、NcoI/HindIIIに挿入した。得られたプラスミドをpTrc99A/ γ + α と命名した。

前記プラスミドpTrc99A/ γ + α により、エシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

前記pKS1、pFLAG-CTS/ α 、pTrc99A/ γ + α のそれぞれのプラスミドによって形質転換したエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を用いて α サブユニットの生産を行った。各形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地3mlに植菌し、37℃で12時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス(1500kgf)で破碎した後、超遠心(4℃、160,400 \times g、90分)により膜画分(10mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0)を分離した。

参考例3 GDH活性の確認

まず前記各膜画分を用いてGDH活性の確認を行った。具体的には594 μ Mのメ

チルフエナジンメトサルフェート (mPMS) および $5.94 \mu\text{M}$ の 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) により、目視判定を行った。結果は以下のとおりである。+ の数は、青色から無色への変化の程度を表す。

pFLAG-CTS/ α による形質転換体培養膜分画	+
pKS1 による形質転換体培養膜分画	++
pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ による形質転換体培養膜分画	+++

α サブユニットのみを組みこんだ pFLAG-CTS/ α による形質転換体培養膜分画の GDH 活性が最も低く、効率良くベクターを構築した pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ による形質転換体培養膜分画が最も高い GDH 活性を示した。

α サブユニットの構造遺伝子のみによるベクターを用いた形質転換体でも α サブユニットは発現されるが、更に γ サブユニットの構造遺伝子を α サブユニットの構造遺伝子と合わせたベクターを用いることにより、効率良く α サブユニットを得ることができた。

本発明のグルコース脱水素酵素を用いてグルコースをアッセイした。本発明のグルコース脱水素酵素 (α サブユニット) を、各種濃度のグルコースで酵素活性を測定した。GDH 活性の測定は $594 \mu\text{M}$ のメチルフエナジンメトサルフェート (mPMS) および $5.94 \mu\text{M}$ の 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) の中で行った。酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え 37°C でインキュベートした時の DCIP の 600nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。本発明の GDH を用いて、 $0.01 \sim 1.0\text{mM}$ の範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例 1 ブルクホルデリア・セパシア KS1 株 GDH β サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セパシア KS1 株 GDH β サブユニットの検索

Sanger Centre のブルクホルデリア・セパシア J2315 株ゲノムデータベース (<http://www.sanger.ac.uk/>) を用いて、KS1 株由来 GDH の β サブユニット遺伝子を検

索した。すでに明らかにされているKS1株GDH β サブユニットのN末端配列（配列番号9）を参考に、アセトバクターS p.、グルコノバクターS p. 由来のアルコール脱水素酵素（Tamaki T. et al., Biochim Biophys Acta 1088(2):292-300 (1991)、Matsushita K., et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 304-310 (1992)、Takemura H., et al., J Bacteriol, 175, 6857-66 (1993)、Kondo K. et al., Appl Environ Microbiol, 63, 1131-8 (1997)）、エルビニアs p.、シュードモナスs p. 由来のグルコン酸脱水素酵素（Yum DY, et al., J Bacteriol, 179, 6566-72, (1997)、Matsushita K. et al., J Biochem, 85, 1173-81 (1979)）、グルコノバイターs p. 由来のソルビトール脱水素酵素（Choi, E.S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 125, 45-50 (1995)）、エルビニアs p.、パントエアs p. 由来の2-ケトグルコン酸脱水素酵素（Pujol CJ et al., J Bacteriol, 182, 2230-7, (2000)）のシトクロームcサブユニットとホモロジーの高いアミノ酸配列（配列番号10）をデザインした。

上記アミノ酸配列を指標として、前記ブルクホルデリア・セバシアJ2315株のデータベースからBLASTを用いてホモロジーの高いアミノ酸配列をコードしている遺伝子配列を検索した。つぎに、得られた5つの配列に対して、KS1株GDH α サブユニットのC末端配列とのホモロジーを検索した結果、2つの遺伝子断片から翻訳されるアミノ酸配列が高いホモロジー（>90%）を示した。各遺伝子断片は200~500bpと短かったので、これらの配列に対して相同性の高い配列を、BLASTを用いてブルクホルデリア・セバシアJ2315株のゲノムデータベースから検索し、各断片をつなぎ合わせた。その結果、3110bpの断片を得た。得られた塩基配列にはGDHのC末端と思われるORFと1275bpからなるシトクロームc構造遺伝子と思われるORFが存在した（配列番号11）。同ORFがコードするアミノ酸配列を配列番号12に示す。得られたJ2315株の塩基配列と既にクローニングされているKS1株 α サブユニット塩基配列を比較した結果、 α サブユニット下流にはJ2315株シトクロームcのシグナルペプチドをコードする塩基配列に相同性の高い塩基配列が含まれていた。

以上のことから、参考例1で得られたブルクホルデリア・セバシアKS1株のクローニング断片中の三番目のORF（配列番号1の塩基番号2386以降）は、 β

ーサブユニットをコードしていると推定された。また、精製された β -サブユニットのN末端におけるアミノ酸配列と、配列番号1中の塩基番号2452～2466の塩基配列によって翻訳される5アミノ酸残基が一致したことから、前記ORFは β サブユニットをコードしていると考えられた。

<2>インバースPCR法を用いた β サブユニット構造遺伝子の増幅

(1) 菌体の培養及びゲノムの抽出

KS1株を5mlの完全培地 (0.5% polypepton、0.3% yeast extract、0.5% NaCl) を用いて37℃で一晩振とう培養した。得られた菌体からGennomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いてゲノムを抽出した。方法は付属のマニュアルに従った。得られたゲノムに対してフェノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿させた後、精製水に溶解した。

(2) ゲノム断片の環状化

KS1株より抽出したゲノムを、BamHI、EcoRI、HindIII、SmaI、SacIおよびXhoIで消化し、エタノール沈殿によってゲノム断片を回収した。制限酵素消化したゲノム1 μ gをDNAライゲーションキット (宝酒造(株)) を用いて16℃で一晩ライゲーション反応を行った。

(3) PCR

KS1株GDH β サブユニットのN末端シグナル配列領域の塩基配列からデザインしたフォワードプライマー (EF1配列番号13) 50pmol, リバースプライマー (ER1配列番号14) 50pmol (プライマーはいずれもInvitrogen社に依頼合成)、LATAq (宝バイオ(株)) 0.5ml、dNTP溶液 8 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ lに精製水を全量50 μ lとなるように加え、プログラムテンプコントロールシステム PC-801 (ASTEC) を用いてPCRを行った。PCRの反応は、以下の条件で行った。94℃ 5分、98℃ 20秒、62℃ 30秒を30サイクルの後、72℃ 6分、72℃ 10分。

SmaIで制限酵素消化したゲノムをテンプレートとした場合において、約2.1kbpの大きさの断片がアガロース電気泳動で確認された。

<3>PCR増幅断片のシーケンシング

(1) TAクローニング

前記のインバースPCR産物をアガロースゲル電気泳動後、バンドを切り出し、Gene clean II KIT (Bio101 inc.) を用いて精製した。この断片を、pGEMR-T and pGEMR-T EASY Vector Systems (Promega) を用いて、pGEM-T Vectorにライゲーションした。ライゲーションを行ったベクターでエシェリヒア・コリDH5 α を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml、X-Gal 40 μ g/ml、IPTG 0.1 μ Mを含むL寒天培地を用いて一晚培養した。出現したコロニーから白色のコロニーを選択し、アンピシリン50 μ g/mlを含むL培地で一晚培養して、菌体からプラスドをアルカリ法により抽出した。

(2) シーケンスサンプルの調製

得られたプラスミドをRNase処理し、これに0.6倍量の20% PEG6000/2.5M NaClを加え、氷上に1時間放置した。その後15000r.p.m、4℃で15分間遠心分離し、ペレットを得た。これを70%エタノールで洗浄し、ペレットを真空乾燥させた。これを精製水に溶解した。

(3) DNA塩基配列の解析

(2) で得られたプラスミドの挿入断片の塩基配列を、ABI PRISMTM310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)を用いて解析した。ベクターのマルチクローニングサイトからM13プライマーを用いて挿入断片の一部の配列を決定した結果、これまでに解析されている β サブユニットN末端を含む塩基配列が確認された。この配列を手がかりにプライマーを順次作製して用い、挿入断片の塩基配列を決定した。結果を配列番号15に示す。また、この塩基配列に含まれるORFがコードするアミノ酸配列を配列番号16に示す。

β サブユニットは、全部で425個のアミノ酸残基から構成されており、すでに得られているN末端アミノ酸配列と比較して、そのうち22残基はシグナルペプチドであると考えらる。アミノ酸配列から計算される分子量は45,276Daであり、シグナルペプチドを除いた分子量42,731Daは、SDS-PAGEから求められたKS1株GDH β サブユニットの分子量43kDaとほぼ同等の値であった。 β サブユニットのアミノ

酸配列中には、シトクローム c においてヘムとの結合モチーフ（配列番号 18）が 3ヶ所に確認された。この ORF は α サブユニット構造遺伝子の ORF のすぐ下流に位置し、開始コドンの上流に SD 配列と思われる配列が存在した。

得られたアミノ酸配列について BLAST によるホモロジー検索を行ったところ、ラルストニア・ソアナセアルム (*Ralstonia solanacearum*) 由来のオキシドレダクターゼ脱水素酵素のシトクローム c サブユニットと 65%、グルコノバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) 由来のソルビトール脱水素酵素のシトクローム c サブユニットと 48%、エルビニア・シプリペディイ (*Eriwinia cypripedi*) 由来のグルコン酸脱水素酵素のシトクローム c サブユニットと 44%、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 由来 2-ケトーグルコン酸脱水素酵素のシトクローム c サブユニットとアミノ酸レベルで 46.4% と、全体にわたって高い相同性を示していた。またこれらのシトクローム c のアミノ酸配列中には、ヘム結合モチーフ（配列番号 18）配列が保存されていた。

尚、KS1 株の GDH β サブユニット構造遺伝子は、J2315 株の GDH β サブユニット構造遺伝子と、塩基配列レベルで 92.0%、アミノ酸レベルで 92.2% の相同性を有している。

産業上の利用の可能性

本発明により、ブルクホルデリア属微生物の GDH β サブユニット及びそれをコードする DNA が提供される。

請求の範囲

1. 以下の (A) または (B) に示すタンパク質。

(A) 配列番号 16 のアミノ酸番号 23～425 からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号 16 のアミノ酸番号 23～425 からなるアミノ酸配列において、1～20 個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

2. 以下の (A) 又は (B) のタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 16 のアミノ酸番号 23～425 からなるアミノ酸配列を少なくとも有するタンパク質。

(B) 配列番号 16 のアミノ酸番号 23～425 からなるアミノ酸配列において、1～20 個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、グルコース脱水素酵素 β サブユニットとして機能し得るタンパク質。

3. 以下の (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 に記載の DNA。

(a) 配列番号 15 の塩基番号 187～1398 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 15 の塩基番号 187～1398 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る DNA。

4. さらに配列番号 15 の塩基番号 121～187 からなる塩基配列を含む請求項 3 に記載の DNA。

5. 請求項 2～4 のいずれか一項に記載の DNA を含有する組換えベクター。

6. 請求項 2～4 のいずれか一項に記載の DNA 又は請求項 5 に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

7. 請求項 6 に記載の形質転換体を培養して、前記 DNA の発現産物としてグルコース脱水素酵素 β サブユニットを産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素 β サブユニットの製造方法。

8. さらにブルクホルデリア・セパシアのグルコース脱水素酵素 α サブユニット及び γ サブユニットをコードする塩基配列を含む請求項 3 又は 4 に記載の DNA。

A。

9. 請求項 8 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

10. 請求項 8 に記載の DNA 又は請求項 9 に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

11. 請求項 10 に記載の形質転換体を培養して、前記 DNA の発現産物としてグルコース脱水素酵素複合体を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素複合体の製造方法。

SEQUENCE LISTING

<110> SODE, Koji

<120> Glucose dehydrogenase beta-subunit and DNA encoding the same

<130> G780-OP1551

<141> 2003-04-25

<150> JP 2002-125353

<151> 2002-04-26

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258).. (761)

<220>

<221> CDS

<222> (764).. (2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386).. (2466)

<400> 1

```

aagctttctg ttgatgtgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggcigatcgt 120
tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgccg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tgc cgt cgc      290

```

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg

2/18

cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa	338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln	
15 20 25	
ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tgc ctg aca ttg	386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu	
30 35 40	
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg	434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met	
45 50 55	
acg ctt tcc gaa tgc ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc	482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile	
60 65 70 75	
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tgc ttc aag acg gcc	530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala	
80 85 90	
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc ggc tcc ggt tgc ctg acg	578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr	
95 100 105	
cct gaa cag gaa tgc ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc	626
Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu	
110 115 120	
ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc	674
Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe	
125 130 135	
ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tgc tat tgc ccc aac aaa	722
Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys	
140 145 150 155	
ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc	769
Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala	
160 165 170	
gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tgc ggt gtc	817
Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val	
175 180 185	
gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg	865
Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val	
190 195 200	
atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag	913
Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu	
205 210 215	
cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg	961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro	
220 225 230	
tgc agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac	1009

Ser	Ser	Pro	Trp	Ala	Pro	His	Pro	Glu	Tyr	Gly	Pro	Pro	Asn	Asp	Tyr		
235					240					245					250		
ctg	atc	ctg	aag	ggc	gag	cac	aag	ttc	aac	tgc	cag	tac	atc	cgc	gcg	1057	
Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Glu	His	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Tyr	Ile	Arg	Ala		
				255					260					265			
gtg	ggc	ggc	acg	acg	tgg	cac	tgg	gcc	gcg	tgc	gcg	tgg	cgc	ttc	att	1105	
Val	Gly	Gly	Thr	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile		
				270					275					280			
ccg	aac	gac	ttc	aag	atg	aag	agc	gtg	tac	ggc	gtc	ggc	cgc	gac	tgg	1153	
Pro	Asn	Asp	Phe	Lys	Met	Lys	Ser	Val	Tyr	Gly	Val	Gly	Arg	Asp	Trp		
				285					290					295			
ccg	atc	cag	tac	gac	gat	ctc	gag	ccg	tac	tat	cag	cgc	gcg	gag	gaa	1201	
Pro	Ile	Gln	Tyr	Asp	Asp	Leu	Glu	Pro	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Ala	Glu	Glu		
				300					305					310			
gag	ctc	ggc	gtg	tgg	ggc	ccg	ggc	ccc	gag	gaa	gat	ctg	tac	tgc	ccg	1249	
Glu	Leu	Gly	Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Glu	Asp	Leu	Tyr	Ser	Pro		
					315				320					325		330	
cgc	aag	cag	ccg	tat	ccg	atg	ccg	ccg	ctg	ccg	ttg	tgc	ttc	aac	gag	1297	
Arg	Lys	Gln	Pro	Tyr	Pro	Met	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ser	Phe	Asn	Glu		
				335					340					345			
cag	acc	atc	aag	acg	gcg	ctg	aac	aac	tac	gat	ccg	aag	ttc	cat	gtc	1345	
Gln	Thr	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Asn	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	His	Val		
				350					355					360			
gtg	acc	gag	ccg	gtc	gcg	cgc	aac	agc	cgc	ccg	tac	gac	ggc	cgc	ccg	1393	
Val	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asp	Gly	Arg	Pro		
				365					370					375			
act	tgt	tgc	ggc	aac	aac	aac	tgc	atg	ccg	atc	tgc	ccg	atc	ggc	gcg	1441	
Thr	Cys	Cys	Gly	Asn	Asn	Asn	Cys	Met	Pro	Ile	Cys	Pro	Ile	Gly	Ala		
				380					385					390			
atg	tac	aac	ggc	atc	gtg	cac	gtc	gag	aag	gcc	gaa	cgc	gcc	ggc	gcg	1489	
Met	Tyr	Asn	Gly	Ile	Val	His	Val	Glu	Lys	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Ala		
				395					400					405		410	
aag	ctg	atc	gag	aac	gcg	gtc	gtc	tac	aag	ctc	gag	acg	ggc	ccg	gac	1537	
Lys	Leu	Ile	Glu	Asn	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Thr	Gly	Pro	Asp		
				415					420					425			
aag	cgc	atc	gtc	gcg	gcg	ctc	tac	aag	gac	aag	acg	ggc	gcc	gag	cat	1585	
Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Tyr	Lys	Asp	Lys	Thr	Gly	Ala	Glu	His		
				430					435					440			
cgc	gtc	gaa	ggc	aag	tat	ttc	gtg	ctc	gcc	gcg	aac	ggc	atc	gag	acg	1633	
Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Ile	Glu	Thr		
				445					450					455			
ccg	aag	atc	ctg	ctg	atg	tcc	gcg	aac	cgc	gat	ttc	ccg	aac	ggt	gtc	1681	
Pro	Lys	Ile	Leu	Leu	Met	Ser	Ala	Asn	Arg	Asp	Phe	Pro	Asn	Gly	Val		

4/18

460	465	470	
gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc			1729
Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			
475	480	485	490
acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc			1777
Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			
	495	500	505
ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc			1825
Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			
	510	515	520
gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc			1873
Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			
	525	530	535
gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc			1921
Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			
	540	545	550
gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag			1969
Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			
555	560	565	570
ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg			2017
Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val			
	575	580	585
ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc			2065
Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile			
	590	595	600
acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc			2113
Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg			
	605	610	615
gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg			2161
Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val			
	620	625	630
ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc			2209
Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile			
635	640	645	650
atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg			2257
Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr			
	655	660	665
ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc			2305
Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr			
	670	675	680
gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg			2353
Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg			
	685	690	695

5/18

atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc 2403
 Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu
 700 705 710
 act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
 Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
 715 720 725
 gcc gat gcg gcc gat c 2467
 Ala Asp Ala Ala Asp
 730

<210> 2
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 2
 Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
 20 25 30
 Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
 35 40 45
 Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
 50 55 60
 Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
 85 90 95
 Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
 100 105 110
 Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
 115 120 125
 Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
 130 135 140
 Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
 145 150 155 160
 Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
 165

<210> 3
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

6/18

<400> 3

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
 290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly

$\langle 210 \rangle$ 4
 $\langle 211 \rangle$ 27
 $\langle 212 \rangle$ PRT
 $\langle 213 \rangle$ Burkholderia cepacia

<400> 4
Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
1 5 10 15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp
20 25

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

cccaagcttg ggccgatacc gatacgca

28

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gagaagcttt ccgcacggtc agacttcc

29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

catgccatgg cacacaacga caacact

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

cccaagcttg ggtcagactt ccttcttcag c

31

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

9/18

<213> Burkholderia cepacia

<400> 9

Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus

<220>

<221> UNSURE

<222> (6, 17, 18, 19, 22)

<223> Xaa=unknown

<400> 10

Ala Asp Ala Ala Asp Xaa Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Asp Cys Xaa Ala Cys His

20

25

<210> 11

<211> 2410

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (673).. (1950)

<400> 11

gatggaccac ccgggcaccg gcgtgtcgtt ctacgcgaac gagaagctgt ggccggggccg 60
cggcccgag gatgtgacgt cgctgatcgg ttccgcgac ggcccggttc gcgcgaccga 120
agccgcgaag aagatccatc tgtcgaacat gtcccgcatc aaccaggaga cgcagaagat 180
cttcaaggcc ggcaaactga tgaagcacga ggagctcgac gcgcagatcc gcgaccgttc 240
cgcgcgctac gtgcagttcg actgcticca cgagattctg ccgcagcccc agaaccgcat 300
cggtgccgagc aagacggcca ccgacgcgat cgggatcccc cgccccgaga tcacgtatgc 360
gatcgacgat tacgtgaagc gcggcgccgt gcacacgcgc gaggcttacg cgacggccgc 420
gaaggtgctg ggcggcaccg acgtcgtctt caacgacgag ttgcgcccga acaaccacat 480

10/18

cacgggcgcg aggatcatgg gcgcggatgc acgcgactcg gtcgtcgaca aggactgccg 540
 cacgttcgac catccgaacc tgttcctctc gagcagctcg acgatgccga ccgtcgggtac 600
 ggtagaacgtg acgctgacga tcgcggcgct cgcgctgcgg atgtcggaca cgtgaagaa 660
 ggaagtctga cc gtg cgg aaa tct act ctc acc ttc ctc ctc gcc ggc tgc 711
 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Leu Ala Gly Cys
 1 5 10
 ctc gcg ctg ccc ggc ctc gca cgc gcg gcc gat tcg gcc gat ccg gcg 759
 Leu Ala Leu Pro Gly Leu Ala Arg Ala Ala Asp Ser Ala Asp Pro Ala
 15 20 25
 cat gtc aag cgc ggc gaa tac ctc gcc gtc gcg ggc gac tgc atg gca 807
 His Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Val Ala Gly Asp Cys Met Ala
 30 35 40 45
 tgc cac acc gcg aag ggc ggc aag ccg ttc gcg ggc ggc ctc ggc atg 855
 Cys His Thr Ala Lys Gly Gly Lys Pro Phe Ala Gly Gly Leu Gly Met
 50 55 60
 ccg gtg ccg atg ctc ggc aag atc tat acg agc aac atc aca ccg gat 903
 Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp
 65 70 75
 ccc gat acc ggc atc ggc aac tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg 951
 Pro Asp Thr Gly Ile Gly Asn Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala
 80 85 90
 gtg cgg cac ggc gta tcg aag aac ggc gac aac ctg tac ccg gcg atg 999
 Val Arg His Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met
 95 100 105
 ccg tac gtg tcg tac gcg aag atc aac gac gac gac gtg caa gcg ctg 1047
 Pro Tyr Val Ser Tyr Ala Lys Ile Asn Asp Asp Asp Val Gln Ala Leu
 110 115 120 125
 tac gcg tac ttc atg cac ggc gtc gaa ccg gtc aag cag gcg ccg ccg 1095
 Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro
 130 135 140
 aag aac gag atc ccc gcg ctg ctg agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc 1143
 Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile
 145 150 155
 tgg aac tgg ctg ttc ctg aag gac ggc gtg tac cag ccg aag ccc gag 1191
 Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Pro Glu
 160 165 170
 cag agc gcc gag tgg aac cgc ggc gcc tat ctc gtg cag ggc ctc gcg 1239
 Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala
 175 180 185
 cac tgc agc acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag 1287
 His Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys
 190 195 200 205
 tcg ctc gac gaa acg ggc ggc agc ttc ctg tcg ggc tcg gtg ctc gcg 1335

11/18

Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Ala			
				210					215				220					
ggc	tgg	gac	ggc	tac	aac	atc	acg	tcc	gac	ccg	aac	gcg	ggg	atc	ggc	1383		
Gly	Trp	Asp	Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly			
				225					230				235					
ggc	tgg	acg	cag	cag	cag	ctc	gtc	cag	tac	ctg	cgc	acc	ggc	agc	gtg	1431		
Gly	Trp	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Tyr	Leu	Arg	Thr	Gly	Ser	Val			
				240					245				250					
ccg	ggc	ctc	gcg	cag	gcg	gcc	ggc	ccg	atg	gcc	gag	gcg	atc	gag	cac	1479		
Pro	Gly	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Glu	His			
				255					260				265					
agc	ttc	tcg	aag	atg	acc	gaa	gcc	gac	atc	ggc	ggc	ccg	atg	gcc	gag	1527		
Ser	Phe	Ser	Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	Ala	Glu			
270					275					280				285				
gcg	atc	gag	cac	agc	ttc	tcg	aag	atg	acc	gaa	gcc	gac	atc	ggc	cgc	1575		
Ala	Ile	Glu	His	Ser	Phe	Ser	Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Arg			
				290					295				300					
tcg	tcg	tgg	ggc	aag	ccg	gcc	gag	gat	ggc	ctg	aag	ctg	cgc	ggc	gtc	1623		
Ser	Ser	Trp	Gly	Lys	Pro	Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Gly	Val			
				305					310				315					
gcg	ctc	gcg	tcg	tcg	ggc	atc	gat	ccg	gca	ccg	ctg	tat	ctc	ggc	aac	1671		
Ala	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn			
				320					325				330					
tgc	gcg	acc	tgc	cac	cag	atg	cag	ggc	aag	ggc	acg	ccg	gac	ggt	tac	1719		
Cys	Ala	Thr	Cys	His	Gln	Met	Gln	Gly	Lys	Gly	Thr	Pro	Asp	Gly	Tyr			
				335					340				345					
tac	ccg	ccg	ttg	ttc	cac	aac	tcg	acg	gtc	ggc	gcg	tcg	aat	ccg	acc	1767		
Tyr	Pro	Pro	Leu	Phe	His	Asn	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Thr			
350					355					360				365				
aac	ctc	gtg	cag	gtg	atc	ctg	aac	ggc	gtg	cag	cgc	aag	gcc	ggc	agc	1815		
Asn	Leu	Val	Gln	Val	Ile	Leu	Asn	Gly	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Gly	Ser			
				370					375				380					
gag	gac	gtc	ggg	atg	ccc	gcg	ttc	cgc	cac	gag	ctg	tcg	gat	gcg	cag	1863		
Glu	Asp	Val	Gly	Met	Pro	Ala	Phe	Arg	His	Glu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gln			
				385					390				395					
atc	gcc	gcg	ctg	acg	aac	tac	ctg	acg	ggg	cag	ttc	ggc	aat	ccg	gcc	1911		
Ile	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gln	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala			
				400					405				410					
gcg	aag	gtg	acc	gag	cag	gac	gtc	gcg	aag	ctg	cgc	tga	aacgcggcac			1960		
Ala	Lys	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Arg							
				415					420				425					
gcggcgaggc agggcaacaa tagaaaagag gaggagcaca gcacatcggg cgggccccga																2020		
tgccggttgt tgcagagcgg gacgggcggc gcaggcggtc gcccgctcctg gticacaggc																2080		

12/18

aatccggtgc gcgcacgccg cgcatcgttt tcgtigatcg agaccatgac accgaaccaa 2140
 ccgtttctcg cgicccagcg cgatgtgctg ctgctgctgt cccgaatcct gctcgtgac 2200
 ctgttcgtga tgttcggctg gaagaagatt atcgacttct ccggtacgat cgcgttcatg 2260
 ggcagcgagg gcgcgcgggc gccgatcacc tcggcggcga tciccgctgt gatggagctc 2320
 atcgtcggga ttgcgaccc cgtcggtttc cagacgcggc cgctcgcgt gttgcttgcg 2380
 ctgtacacga tcggtaccgg catcatcggc 2410

<210> 12

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 12

Val	Arg	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu
1				5				10					15		
Pro	Gly	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Asp	Pro	Ala	His	Val	Lys
		20					25					30			
Arg	Gly	Glu	Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	Cys	Met	Ala	Cys	His	Thr
	35					40				45					
Ala	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Pro	Val	Pro
	50				55					60					
Met	Leu	Gly	Lys	Ile	Tyr	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Asp	Pro	Asp	Thr
	65			70				75						80	
Gly	Ile	Gly	Asn	Trp	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Glu	Arg	Ala	Val	Arg	His
			85					90					95		
Gly	Val	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Pro	Ala	Met	Pro	Tyr	Val
		100						105				110			
Ser	Tyr	Ala	Lys	Ile	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Gln	Ala	Leu	Tyr	Ala	Tyr
	115					120						125			
Phe	Met	His	Gly	Val	Glu	Pro	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Lys	Asn	Glu
	130					135					140				
Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Arg	Trp	Pro	Leu	Lys	Ile	Trp	Asn	Trp
	145				150					155				160	
Leu	Phe	Leu	Lys	Asp	Gly	Val	Tyr	Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Ala
			165					170					175		
Glu	Trp	Asn	Arg	Gly	Ala	Tyr	Leu	Val	Gln	Gly	Leu	Ala	His	Cys	Ser
		180						185					190		
Thr	Cys	His	Thr	Pro	Arg	Gly	Ile	Ala	Met	Gln	Glu	Lys	Ser	Leu	Asp
	195					200						205			
Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Ala	Gly	Trp	Asp
	210					215						220			
Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Trp	Thr
	225				230					235				240	

13/18

Gln	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Tyr	Leu	Arg	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Gly	Leu			
				245					250					255				
Ala	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Glu	His	Ser	Phe	Ser			
			260					265					270					
Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Glu			
		275					280					285						
His	Ser	Phe	Ser	Lys	Met	Thr	Glu	Ala	Asp	Ile	Gly	Arg	Ser	Ser	Trp			
	290					295					300							
Gly	Lys	Pro	Ala	Glu	Asp	Gly	Leu	Lys	Leu	Arg	Gly	Val	Ala	Leu	Ala			
305					310					315				320				
Ser	Ser	Gly	Ile	Asp	Pro	Ala	Pro	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	Cys	Ala	Thr			
				325					330					335				
Cys	His	Gln	Met	Gln	Gly	Lys	Gly	Thr	Pro	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Pro			
			340					345					350					
Leu	Phe	His	Asn	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Thr	Asn	Leu	Val			
		355					360					365						
Gln	Val	Ile	Leu	Asn	Gly	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Gly	Ser	Glu	Asp	Val			
	370					375					380							
Gly	Met	Pro	Ala	Phe	Arg	His	Glu	Leu	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Ala			
385					390					395				400				
Leu	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gln	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Val			
				405					410					415				
Thr	Glu	Gln	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Arg										
			420					425										

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

tgcaccgtgc ggaaatctac tctcact

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

acttccttct tcagcgtgtc cgacatc

27

<210> 15

<211> 1441

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (121)..(1398)

<400> 15

```

tccgaacctg ttcatttcga gcagcgcgac gatgccgacc gtcggtaccg taaacgtgac 60
gctgacgata gccgcgctcg cgtgcggat gtcggacacg ctgaagaagg aagtctgacc 120
gtg cgg aaa tct act ctc act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg 168
Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
      1              5              10              15
ccg ggc ttc gcg cgc gcg gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag 216
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
              20              25              30
cgc ggc gaa tac ctc gcg acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag 264
Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
              35              40              45
atc tac acg agc aac atc acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg 312
Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
              50              55              60
gcc tgc cac acc gtg aag ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc 360
Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
              65              70              75              80
ggc atc ggc aaa tgg acg ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac 408
Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
              85              90              95
ggc gtg tcg aag aac ggc gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg 456
Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
              100              105              110
tcg tac gcg aag atc aag gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac 504
Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
              115              120              125
ttc atg cac ggc gtc gag ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag 552
Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
              130              135              140

```

PCT/JP03/05375

atc cca gcg ctg cta agc atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg	600
Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp	
145 150 155 160	
ctg ttc ctg aag gac ggc ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc	648
Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala	
165 170 175	
gaa tgg aat cgc ggc gcg tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc	696
Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser	
180 185 190	
acg tgc cac acg ccg cgc ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac	744
Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp	
195 200 205	
gaa acc ggc ggc agc ttc ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac	792
Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp	
210 215 220	
ggc tac aac atc acg tcg gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg	840
Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr	
225 230 235 240	
cag cag cag ctc gtg cag tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc	888
Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val	
245 250 255	
gcg cag gcg gcc ggg ccg atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg	936
Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser	
260 265 270	
aag atg acc gaa gcg gac atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg	984
Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr	
275 280 285	
gtg ccg gcc gtt gcc gac agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg	1032
Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp	
290 295 300	
ggc aag ccg gcc gag gac ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg	1080
Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala	
305 310 315 320	
tcg tcg ggc atc gat ccg gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg	1128
Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr	
325 330 335	
tgc cac cag atg cag ggc aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tcg	1176
Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser	
340 345 350	
ctg ttc cac aac tcc acc gtc ggc gcg tcg aat ccg tcg aac ctc gtg	1224
Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val	
355 360 365	
cag gtg atc ctg aac ggc gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc	1272

16/18

Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380
 ggg atg ccc gct ttc cgc tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg 1320
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 ctg acg aac tac gtg acc gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg 1368
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 acg gag cag gac gtc gcg aag ctg cgc tga catagtcggg cgcgccgaca 1418
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425
 cggcgcaacc gataggacag gag 1441

<210> 16

<211> 425

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 16

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30
 Arg Gly Glu Tyr Leu Ala Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met
 50 55 60
 Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His
 85 90 95
 Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val
 100 105 110
 Ser Tyr Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr
 115 120 125
 Phe Met His Gly Val Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu
 130 135 140
 Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp
 145 150 155 160
 Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala
 165 170 175
 Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser
 180 185 190

17/18

Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp
 210 215 220
 Gly Tyr Asn Ile Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr
 225 230 235 240
 Gln Gln Gln Leu Val Gln Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val
 245 250 255
 Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser
 260 265 270
 Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr
 275 280 285
 Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp
 290 295 300
 Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr
 325 330 335
 Cys His Gln Met Gln Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser
 340 345 350
 Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val
 355 360 365
 Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile
 370 375 380
 Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val
 405 410 415
 Thr Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
 420 425

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: heme binding motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (2, 3)

<223> Xaa=unknown

<400> 17

Cys Xaa Xaa Cys His

1

5

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 18

catgccatgg cacacaacga caacact

27

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

cccaagcttg ggtcagactt ccttcctcag c

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/05375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SODE, K. et al., A novel thermostable glucose dehydrogenase varying temperature properties by altering its quaternary structures Enzyme Microb.Technol., 1996, 19(2), pages 82 to 85	1-11
P, X	WO 02/36779 A1 (Koji SODE), 10 May, 2002 (10.05.02), Full text (Family: none)	1-11
A	YAMAZAKI, T. et al., Subunit analyses of a novel thermostable glucose dehydrogenase showing different temperature properties according to its quaternary structure Appl.Biochem.Biotechnol., 1999, 77-79, pages 325 to 335	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 25 June, 2003 (25.06.03)	Date of mailing of the international search report 15 July, 2003 (15.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05375

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAZAKI, T. et al., Increased thermal stability of glucose dehydrogenase by cross-linking chemical modification Biotechnol.lett., 1999, 21(3), pages 199 to 202	1-11
P,A	INOSE, K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli Biochim.Biophys.Acta., 2003 February, 1645(2), p.133-8	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl¹ C12N15/09, 9/04, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SODE K. et al., A novel thermostable glucose dehydrogenase varying temperature properties by altering its quaternary structures Enzyme Microb. Technol., 1996, 19 (2), p. 82-85	1-11
PX	WO 02/36779 A1 (早出広司) 2002. 05. 10, 全文 (ファミリーなし)	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 06. 03

国際調査報告の発送日

15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YAMAZAKI T. et al., Subunit analyses of a novel thermostable glucose dehydrogenase showing different temperature properties according to its quaternary structure Appl. Biochem. Biotechnol. , 1999, 77-79, p. 325-335	1-11
A	YAMAZAKI T. et al., Increased thermal stability of glucose dehydrogenase by cross-linking chemical modification Biotechnol. lett. , 1999, 21 (3), p. 199-202	1-11
PA	INOSE K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli Biochim. Biophys. Acta. , 2003 Feb, 1645 (2), p. 133-8	1-11